

PENGARUH PEMBERIAN RANITIDINE TERHADAP HISTOPATOLOGI HIPOKAMPUS TIKUS WISTAR DENGAN INTOKSIKASI METANOL AKUT

Fernando¹, Muhammad Thohar Arifin², Ika Pawitra Miranti³

¹Mahasiswa Program Pendidikan S-1 Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

²Staf Pengajar Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

³Staf Pengajar Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro
JL. Prof. H. Soedarto, SH, Tembalang-Semarang 50275, Telp.02476928010

ABSTRAK

Latar belakang : Metanol merupakan salah satu senyawa yang dapat merusak secara sistemik akibat dari asidosis. Salah satu organ yang terkena dampak adalah hipokampus. Ranitidine diketahui dapat menurunkan kadar asam format dalam darah sehingga dapat mengurangi dampak toksik dari metanol.

Tujuan : Mengetahui pengaruh pemberian ranitidine terhadap histopatologi hipokampus tikus Wistar dengan intoksikasi metanol akut.

Metode : Penelitian *true experimental* dengan rancangan *parallel post test only control group design* ini menggunakan tikus strain Wistar jantan usia 2-3 bulan (n=15) yang secara random dibagi menjadi 3 kelompok (kelompok kontrol negatif (n=5), kelompok kontrol positif (n=5), dan perlakuan (n=5)). Pada 8 jam setelah pemberian perlakuan, otak tikus diambil dan diperiksa persentase nekrosis dari sel hipokampus dengan pengecatan HE . Uji statistik yang digunakan uji *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan uji *Mann-Whitney* untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.

Hasil : Pada penelitian ini didapatkan peningkatan jumlah sel nekrosis hipokampus pada kelompok kontrol positif dibandingkan kontrol negatif dan penurunan pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol positif. Terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol positif dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (p=0.008), dan perlakuan (p=0.008). Akan tetapi tidak ada perbedaan antara kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (p=0.690).

Simpulan : Pemberian ranitidine dapat mengurangi derajat nekrosis sel pada sel hipokampus tikus Wistar dengan intoksikasi metanol akut.

Kata Kunci : Ranitidine, nekrosis hipokampus, intoksikasi metanol akut.

ABSTRACT

THE EFFECT OF RANITIDINE INTERVENTION ON HIPPOCAMPUS HISTOPATHOLOGY OF ACUTE METHANOL INTOXICATED WISTAR

Background: Methanol is one of the compounds that can cause systemic damage due to acidosis. One of the organs affected is the hippocampus. Ranitidine is known to reduce the levels of formic acid in the blood and as the consequence will reduce the toxic effects of methanol.

Objective: To determine the effect of ranitidine on the hippocampus histopathology of acute methanol intoxicated Wistar rats.

Methods: True experiment research design with parallel post test only control group design. Wistar strain rats aged 2-3 months ($n = 15$) were randomly divided into 3 groups (negative control group ($n = 5$), the positive control group ($n = 5$), and treatment ($n = 5$)). At 8 hours post-treatment, the mouse brains were taken and the percentage of necrosis hippocampal cells were examined with HE staining. Kruskal-Wallis and continued using Mann-Whitney statistical analysis were done to seek the difference between control and treatment groups.

Results: In this study, there was an increase in the number of necrosis hippocampal cells in positive control group compared to the negative control group and a decrease in the treatment group compared to the positive control group. There were significant differences between the negative control group ($p = 0.008$), and treatment ($p = 0.008$) compared with the positive control group. However, there is no difference between the treatment groups compared to the negative control group ($p = 0.690$).

Conclusion: Intervention of ranitidine may decrease necrosis degree of hippocampal cells of Wistar rats with acute methanol intoxicated.

Keywords: Ranitidine, hippocampus necrosis, acute methanol intoxication.

PENDAHULUAN

Metanol merupakan produk denaturasi alkohol (etanol) sehingga metanol berbahaya jika diminum.¹ Metanol sangat mudah diabsorpsi oleh tubuh secara ingesti, inhalasi, atau kontak langsung. Metanol mudah menguap sehingga berbahaya jika tidak disimpan dengan baik. Metanol sangat sering digunakan dalam kehidupan sehari-hari sebagai bahan penambah bensin, bahan pemanas ruangan, pelarut industri, campuran pada larutan fotokopi, serta sebagai bahan makanan untuk bakteri yang memproduksi protein.^{1,2}

Meningkatnya keracunan metanol ini disebabkan oleh peningkatan konsumsi dari minuman beralkohol yang diproduksi secara informal. Wabah keracunan metanol terjadi pada beberapa tahun terakhir ini di Kamboja, Republik Ceko, Ekuador, Estonia, India, Indonesia, Kenya, Libya, Nikaragua, Norwegia, Pakistan, Turki, dan Uganda dengan jumlah korban sebanyak 20-800 korban yang 30%-nya berakibat cukup fatal.³

Keracunan metanol dapat menimbulkan gangguan kesadaran, gangguan saluran cerna bahkan kebutaan.¹⁻³ Metanol sendiri sebenarnya tidak berbahaya, tetapi produk dari metabolisme metanol dalam tubuh yang mengakibatkan gangguan pada tubuh manusia. Hasil metabolisme dari metanol dalam tubuh adalah asam format, zat ini sangat bersifat toksik bagi tubuh.^{1,2,4,5}

Penanganan keracunan metanol biasanya dilakukan dengan pemberian antidotum (fomepizole atau etanol), pemberian asam folat, koreksi asidosis, dan hemodialisis untuk meningkatkan eliminasi metanol.² Baru-baru ini ditemukan efek ranitidine yang dapat

menurunkan kadar asam format dalam darah. Ranitidine memiliki kemampuan untuk menghambat enzim alkohol dehidrogenase yang akhirnya mengurangi efek dari toksisitas metanol.⁴

METODE

Penelitian yang dilakukan adalah eksperimental murni dengan desain penelitian *Post Test Only Control Group Design* yaitu 15 ekor tikus dibagi menjadi 3 kelompok, kelompok Kontrol Negatif (KN), kelompok Kontrol Positif (KP), dan kelompok Perlakuan (P). Jumlah sampel tiap kelompok adalah 5 ekor berdasarkan ketentuan WHO dengan prinsip 3R (*reduction, replacement, and refinement*). Sampel penelitian adalah tikus wistar jantan berusia 2-3 bulan dengan berat badan 150-250g, tidak termasuk tikus yang tampak sakit atau memiliki kelainan anatomis. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Universitas Negeri Semarang, Laboratorium Sentral Rumah Sakit Nasional Diponegoro, dan Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Diponegoro. Penelitian ini dilakukan pada bulan April-Mei 2016.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ranitidin dengan dosis 30mg/kgbb intraperitoneal sesuai dengan penelitian sebelumnya.⁴ Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah derajat nekrosis neuron pada hipokampus tikus wistar dengan intoksikasi metanol akut dengan dosis 14g/kgbb per oral sesuai dengan penelitian sebelumnya.¹ Kelompok KN diberi aquades per oral dan ditusuk di perut. Kelompok KP diberi metanol dengan dosis letal per oral dan ditusuk di perut. Kelompok P diberi larutan metanol dosis letal per oral dan ranitidin per intraperitoneal 1jam setelah pemberian metanol. Pemberian metanol diberikan dengan sonde sampai habis. Setelah itu tikus akan didekapitasi setelah waktu yang ditentukan yaitu 8 jam.

Setelah tikus didekapitasi, selanjutnya dilakukan autopsi untuk pengambilan otak tikus dengan potongan -0.82 *anterior bregma* untuk mendapatkan gambaran hipokampus. Organ otak tersebut kemudian dimasukkan ke dalam botol plastik berisi larutan buffer formalin 10% untuk diolah mengikuti metode baku histologi dengan pewarnaan Hemaktosilin Eosin (HE). Pembacaan dilakukan pada area *Cornu Ammonis* (CA) 1 sampai CA 2 hingga didapatkan 100 sel dan dikelompokkan untuk menentukan persentase nekrosis dan derajatnya menurut pembagian berikut:

Tabel 1. Derajat nekrosis

Persentase Nekrosis	Derajat
0%	0
1-25%	1
26-50%	2
51-75%	3
76-100%	4

Hasil pembacaan dilakukan oleh peneliti dan ahli kemudian dilakukan uji *Cronbach's Alpha* untuk uji reliabilitas data. Dikatakan sangat baik apabila diantara 0,80-0,99. Untuk menguji normalitas data menggunakan *Shapiro-Wilk* dan didapatkan sebaran data tidak normal sehingga dilanjutkan dengan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk membandingkan antar kelompok. Hasil dikatakan bermakna apabila $p < 0,05$

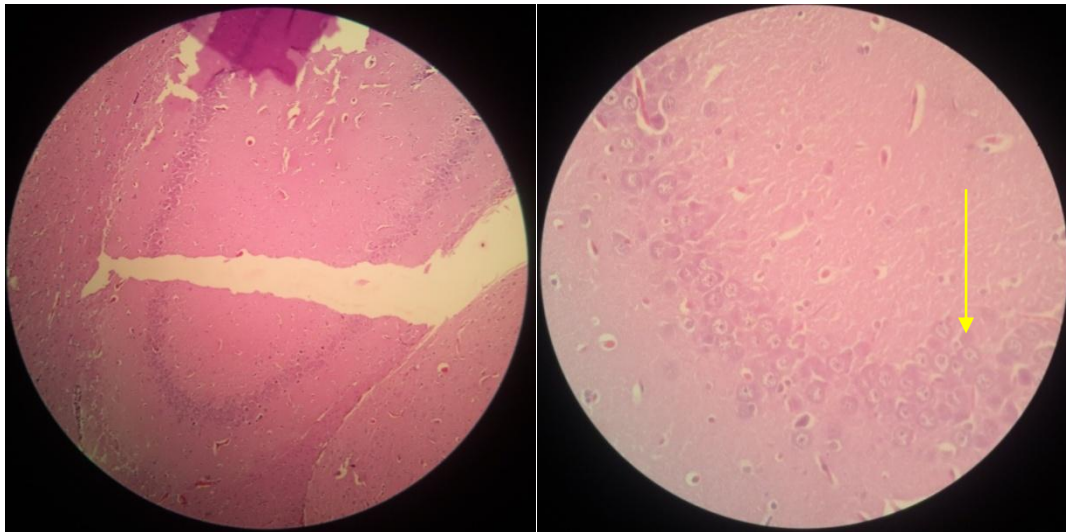
HASIL

Untuk analisis statistik berat badan tikus Wistar telah memenuhi asumsi normalitas *Shapiro-Wilk* dengan $p = 0,629$ dan homogenitas *Lavene Test* dengan $p = 0,292$ sehingga berat badan tikus masing-masing kelompok dikatakan homogen.

Penelitian menggunakan 15 ekor tikus wistar jantan lalu didekapitasi setelah 8 jam perlakuan dengan cara dislokasi vertebra servikalis.. Hasil pengamatan gambaran mikroskopis hepar dilakukan uji *Cronbach's Alpha* dan didapatkan nilai *Cronbach's Alpha* $p = 0,985$ yang artinya sangat baik. Berikut ini merupakan tabel hasil pemeriksaan mikroskopis hipokampus:

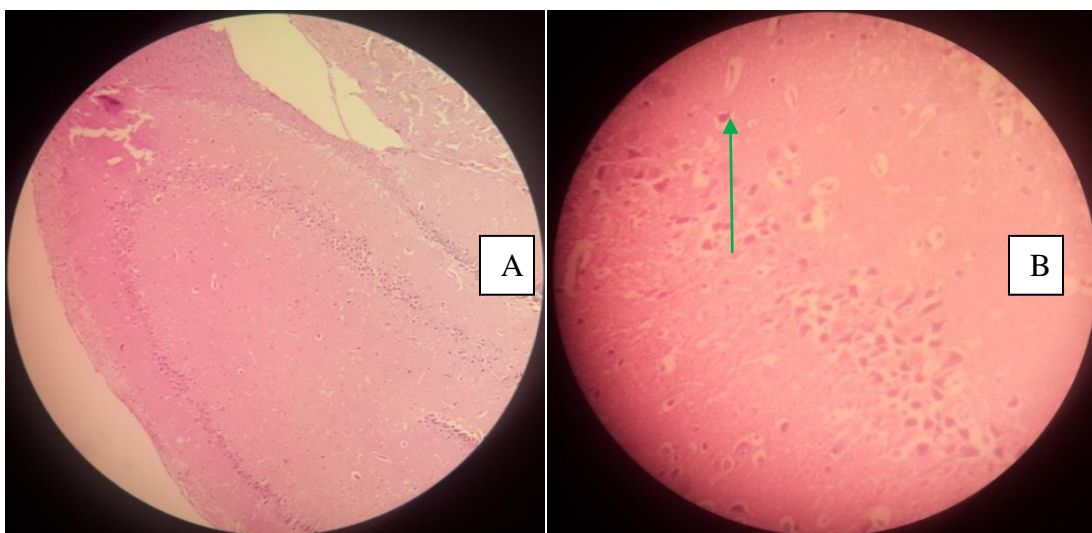
Tabel 2. Derajat Nekrosis Hipokampus

Sampel/Grade	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Total
KN	0	4	1	0	0	5
KP	0	0	0	4	1	5
P	0	3	2	0	0	5
Total	0	7	3	4	1	15



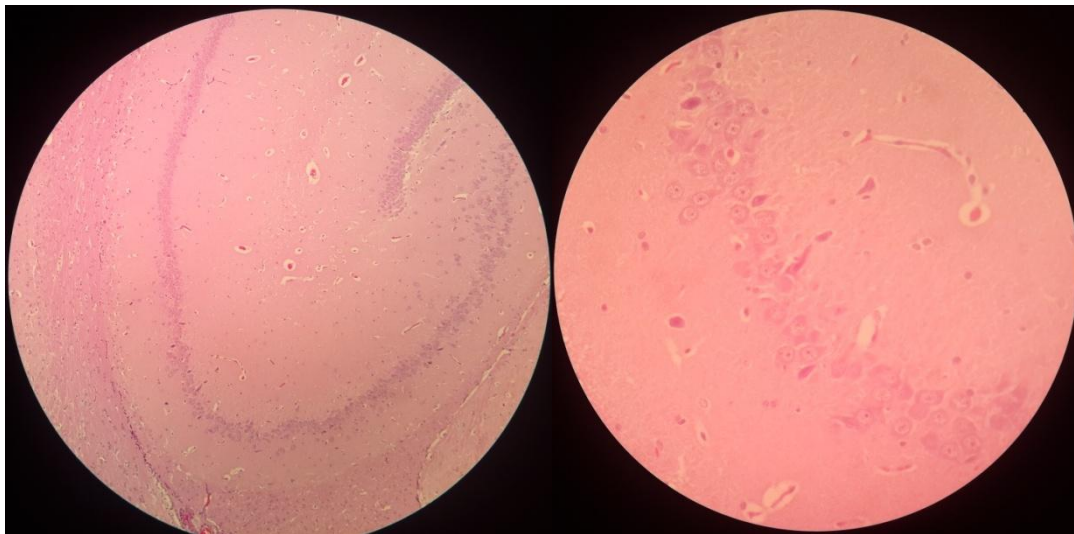
Gambar 1. Gambaran histologi hipokampus tikus wistar kelompok KN

Perbesaran: (A) 100X dan (B) 400X (HE). Panah hijau menunjukan sel yang masih normal dan panah kuning menunjukan sel yang mengalami nekrosis. Pada kelompok kontrol negatif terdapat sedikit gambaran nekrosis dan didominasi sel yang masih normal.



Gambar 2 Gambaran histologi hipokampus tikus wistar kelompok KP

Perbesaran: (A) 100X dan (B) 400X (HE). Panah hijau menunjukan sel yang masih normal dan panah kuning menunjukan sel yang mengalami nekrosis. Pada kelompok kontrol positif didapatkan gerombolan sel yang mengalami nekrosis dan sedikit sel normal.



Gambar 3. Gambaran histologi hipokampus tikus wistar kelompok P

Perbesaran: (A) 100X dan (B) 400X (HE). Panah hijau menunjukkan sel yang masih normal dan panah kuning menunjukkan sel yang mengalami nekrosis. Pada kelompok perlakuan didapatkan banyak sel normal dan kurang lebih sama dengan kelompok kontrol negatif.

Pemeriksaan mikroskopis hipokampus menunjukkan bahwa kelompok KP memiliki tingkat nekrosis yang tertinggi, kelompok KN memiliki tingkat nekrosis terendah, dan kelompok P memiliki tingkat nekrosis yang lebih rendah dari KP dan lebih tinggi sedikit dari KN.

Tabel 3. Hasil Perhitungan Jumlah Nekrosis Hipokampus

Kelompok Perlakuan	Rerata \pm SB (Min-Maks)
KN	1,20 \pm 0,447(1-2)
KP	3,20 \pm 0,447(3-4)
P	1,40 \pm 0,548(1-2)

Uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*: df: 2 $p=0,004$ (bermakna bila $p<0,05$)

Dilakukan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis* dan didapatkan $p = 0,004$ yang artinya didapatkan perbedaan bermakna paling tidak antara 2 kelompok sampel dan kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

Tabel 4. Perbedaan jumlah sel nekrosis pada hipokampus antar kelompok perlakuan

Kelompok	KP	P
KN	$p=0,008^*$	$p=0,690$
KP	-	$p=0,008^*$

Uji *Mann-Whitney*, p = nilai kebermaknaan (bermakna bila $p<0,05$).

Tabel 6 menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok KP dengan kelompok KN dan P. Sedangkan tidak didapatkan perbedaan antara kelompok KN dengan kelompok P.

PEMBAHASAN

Secara fisiologis, metanol akan dimetabolisme didalam hepar dengan menggunakan enzim alkoholdehidrogenase menjadi formaldehid. Formaldehid kemudian akan diubah menjadi asam format dengan bantuan enzim formaldehid- dehidrogenase. Kemudian asam format akan diekskresikan keluar dari tubuh dalam bentuk karbondioksida dan air.⁵⁻⁸ Saat ini, penanganan metanol dilakukan dengan cara pemberian *sparing agent* yaitu etanol tetapi pada penelitian sebelumnya disebutkan bahwa pemberian etanol dan metanol secara bersamaan menimbulkan kerusakan yang lebih berat pada hepar tikus wistar.^{2,9} Terdapat beberapa antidotum lain untuk metanol seperti fomepizole, asam folat, dan juga dengan hemodialisa. Fomepizole digunakan untuk menjadi inhibitor dari enzim alkoholdehidrogena sesedangkan asam folat digunakan untuk mempercepat proses metabolisme asam format menjadi karbon dioksida dan air.^{1,4,5,8} Ranitidin diketahui dapat menghambat metabolisme dari metanol dengan cara menghambat enzim alkoholdehidrogenase pada hepar seperti fomepizole sehingga efek merusak dari metanol dapat diminimalisir.⁴

Hasil dari penelitian ini ditemukan bahwa pemberian ranitidin dapat mengurangi kerusakan dari sel-sel hipokampus pada tikus wistar. Hal ini ditunjukkan dengan perbedaan bermakna antara tingkat kerusakan pada tikus kelompok KP yang diberi metanol dosis letal (14g/kgbb) dengan kelompok P yang diberikan metanol dosis letal (14g/kgbb) dan ranitidin (30mg/kgbb) dengan $P=0.008$. Gambaran pada kelompok kontrol negatif dengan perlakuan tidak berbeda secara signifikan ($P=0.690$) sehingga terbukti bahwa ranitidin memiliki efek untuk melindungi sel hipokampus dari nekrosis akibat intoksikasi metanol. Kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif juga terbukti berbeda bermakna dengan $P=0.008$.

Penelitian yang dilakukan El Bakary dkk (2010) menyimpulkan bahwa ranitidine\ lebih signifikan mengurangi efek toksik metanol dibandingkan dengan etanol dan tidak signifikan berbeda dibandingkan MP-4. Ranitidin juga memiliki keunggulan dengan harganya yang murah dan mudah didapatkan. Ranitidin sendiri bekerja yang terutama dengan menghambat enzim alkohol dehidrogenase.⁴ Diketahui pula bahwa antagonis histamin H2

juga menurunkan tingkat permeabilitas zat-zat, memperbaiki *Cerebral Blood Flow*, edema otak dan juga reaksi inflamasi pasca trauma.¹⁰

Penelitian ini juga sesuai dengan yang dilakukan Rubinstein D, dkk (1995) bahwa intoksikasi metanol akut dapat menyebabkan nekrosis putamen dan substansia alba.¹¹ Hipokampus sendiri merupakan struktur subkorteks yang bersifat aktif dan memiliki metabolisme yang cukup tinggi.¹²⁻¹⁴ Kebutuhan energi yang cukup tinggi inilah yang menyebabkan hipokampus sangat terpengaruh apabila terjadi gangguan sistemik. Pada penelitian Ding D (2000) disebutkan bahwa asidosis, hipoksia, dan hipoglikemi dapat menyebabkan nekrosis dan apoptosis neuron.¹⁵ Ketiga hal tersebut juga dipengaruhi oleh *Cerebral Blood Flow* yang menurun yang diakibatkan oleh intoksikasi metanol.¹⁶ Hal ini dapat diperbaiki dengan pemberian antagonis histamin H₂.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Intoksikasi metanol akut dengan dosis letal memberikan efek kerusakan hipokampus dalam bentuk nekrosis. Derajat nekrosis tertinggi pada kelompok KP yaitu kelompok yang diberikan metanol dosis letal, sedangkan derajat nekrosis terendah pada kelompok KN yaitu kelompok yang tidak diberikan perlakuan. Derajat nekrosis kelompok P lebih rendah dari KP dan lebih tinggi dari kelompok KN. Ranitidine berpengaruh dalam menurunkan tingkat nekrosis sel hipokampus pada intoksikasi metanol akut.

Saran

Diperlukan penelitian yang membandingkan antara pemberian ranitidine sebelum dan sesudah pemberian metanol dikarenakan efek dari ranitidine yang bekerja dengan cara mengurangi enzim alkohol dehidrogenase sehingga patut diteliti manakah yang lebih efektif dalam mencegah kerusakan akibat intoksikasi metanol dan juga penelitian lebih lanjut mengenai kerja ranitidine dalam melindungi otak dengan meneliti kadar metanol dalam jaringan otak.

DAFTAR PUSTAKA

1. Barceloux DG, Krenzelok EP, Olson K, Watson W. American Academy of Clinical Toxicology Practice Guidelines on the Treatment of Ethylene Glycol Poisoning. Ad Hoc Committee. J Toxicol Clin Toxicol. 1999;37(5):537–60.
2. WHO. Methanol poisoning outbreaks. 2014;
3. Goldfrank L. Goldfrank's Toxicologic Emergencies. 9th ed. 2011;826
4. El-Bakary A a, El-Dakrory S a, Attalla SM, Hasanein N a, Malek H a. Ranitidine as an alcohol dehydrogenase inhibitor in acute methanol toxicity in rats. Hum Exp Toxicol [Internet]. 2010;29(2):93–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20026516>
5. Methanol Toxicological Overview [Internet]. [cited 2016 Jan 19]. Available from: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/456293/Methanol_TO_PHE_260815.pdf
6. Acid-Base Physiology: 8.6 Metabolic Acidosis due to Drugs and Toxins [Internet]. [cited 2016 Jan 19]. Available from: http://www.anaesthesiamcq.com/AcidBaseBook/ab8_6a.php
7. Dally AM. Fatal Methanol Intoxication – Two Exceptional Cases. Toxichem Krimtech. 2015;
8. ACUTE TOXICITY SUMMARY METHANOL [Internet]. [cited 2016 Jan 19]. Available from: http://oehha.ca.gov/air/acute_rels/pdf/67561a.pdf
9. Nabila N. Pengaruh Pemberian Metanol Dan Etanol terhadap Tingkat Kerusakan Sel Hepar Tikus Wistar. 2011;1–16.
10. Patnaik R, Mohanty S SH. Blockade of histamine H2 receptors attenuate blood-brain barrier permeability, cerebral blood flow disturbances, edema formation and cell reactions following hyperthermic brain injury in the rat. 2000;
11. Rubinstein D, Escott E, Kelly JP. Methanol intoxication with putaminal and white matter necrosis: MR and CT findings. AJNR Am J Neuroradiol [Internet]. 1995;16(7):1492–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7484638>
12. Bartsch T. The Clinical Neurobiology of the Hippocampus: An Integrative View, Volume 151 [Internet]. OUP Oxford; 2012 [cited 2016 Jan 14]. 310 p. Available from: https://books.google.com/books?id=_J0PcQtq5m8C&pgis=1
13. Wright A. Section 4: Homeostasis and Higher Brain Function, Chapter 5. Limbic System: Hippocampus. In: Neuroscience Online: an Electronic Textbook for Neuroscience. 1997.
14. Mega MS, Cummings JL, Salloway S, Malloy P. The limbic system: an anatomic, phylogenetic, and clinical perspective. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 1997;9(3):315–30.
15. Ding D, Moskowitz SI, Li R, Lee SB, Esteban M, Tomaselli K, et al. Acidosis induces necrosis and apoptosis of cultured hippocampal neurons. Exp Neurol [Internet]. 2000;162(1):1–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716884>
16. Singh M, Bhatia R. Emergencies in Neurology. Byword Books Private Limited; 2011. 384 p.